

토끼의 척수 허혈 손상 모델에서 페니토인과 저체온의 신경 보호 효과의 비교

오 삼 세* · 최 기 영** · 김 원 곤***

Neuroprotective Effect of Phenytoin and Hypothermia on a Spinal Cord Ischemic Injury Model in Rabbits

Sam-Sae Oh, M.D.*, Gheeyoung Choe, M.D.***, Won-Gon Kim, M.D.***

Background: Spinal cord ischemic injury during thoracic and thoracoabdominal aortic surgeries remains a potentially devastating outcome despite using various methods of protection. Neuronal voltage-dependent sodium channel antagonists are known to provide neuroprotection in cerebral ischemic models. This study was designed to compare the neuroprotective effects of phenytoin with those of hypothermia in a rabbit model of spinal cord ischemia.

Material and Method: Spinal cord ischemia was induced in New Zealand white rabbits by means of infrarenal aortic cross clamping for 25 minutes. Four groups of 8 animals each were studied. The control group and the hypothermia group received retrograde infusion of saline only (22°C, 2 mL/min); the normothermic phenytoin group and the hypothermicphenytoin group received retrograde infusion of 100 mg of phenytoin at different rectal temperatures (39°C and 37°C, respectively) during the ischemic period. The neurologic function was assessed at 24 and 72 hours after the operation with using the modified Tarlov criteria. The spinal cords were harvested after the final neurologic examination for histopathological examination to objectively quantify the amount of neuronal damage.

Result: No major adverse effects were observed with the retrograde phenytoin infusion during the aortic ischemic period. All the control rabbits became severely paraplegic. Both the phenytoin group and the hypothermia group had a better neurological status than did the control group ($p < 0.05$). The typical morphological changes that are characteristic of neuronal necrosis in the gray matter of the control animals were demonstrated by means of the histopathological examination, whereas phenytoin or hypothermia prevented or attenuated these necrotic phenomena ($p < 0.05$). The number of motor neuron cells positive for TUNEL staining was significantly reduced, to a similar extent, in the rabbits treated with phenytoin or hypothermia. Phenytoin and hypothermia had some additive neuroprotective effect, but there was no statistical significance between the two on the neurological and histopathological analysis. **Conclusion:** The neurological and histopathological analysis consistently demonstrated that both phenytoin and hypothermia may afford significant spinal cord protection to a similar extent during spinal cord ischemia in rabbits, although no significant additive effects were noticed.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:405-416)

Key words: 1. Ischemia
2. Spinal cord
3. Phenytoin

*부천세종병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Sejong General Hospital

**서울대학교 의과대학 분당병원 병리학교실

Department of Pathology, Seoul National University Bundang Hospital, Seoul National University College of Medicine

***서울대학교 의과대학 서울대학교병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine

논문접수일 : 2007년 12월 17일, 심사통과일 : 2008년 3월 3일

책임저자 : 김원곤 (110-744) 서울시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교병원 흉부외과

(Tel) 02-2072-2346, (Fax) 02-717-9672, E-mail: wongon@plaza.snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

서론

대동맥 차단이 불가피한 흉부 및 흉복부 대동맥의 수술은 하반신 마비와 같은 척수의 중대한 허혈성 합병증을 초래할 위험이 항상 따르고 아직도 난제로 남아있다[1-4]. 척수 허혈의 결과 조직병리학적으로는 운동신경세포의 괴사나 세포자멸사와 같은 두 가지 특징을 보인다는 사실은 잘 알려져 있지만 이러한 영구적인 손상을 설명하기 위한 명확한 세포기전은 아직도 밝혀지지 않고 있고 매우 다양한 인자들이 복합적으로 관여할 것으로 추정된다.

한편 여러 다양한 신경손상 모델에서 나트륨이온이 관여한다는 연구 결과가 있는데 이들 중 척수 손상에 나트륨이온이 밀접한 연관성을 가지는 것은 주목할 만하다[5]. 허혈성 손상의 연속단계 초기에 발생하는 나트륨의 세포 내 유입은 세포의 탈분극을 촉진하여 칼슘과 포타슘 채널을 더욱 활성화하고, 칼슘의존성 글루타메이트 유리를 촉진한다. 더 나아가 지속적인 나트륨의 세포 내 유입은 ATP를 고갈시키며, 전해질 균형을 맞추기 위한 클로라이드 이온의 이차적인 유입을 초래하여 세포부종을 더욱 촉진하고 나트륨/칼슘 및 여타의 신경전달물질의 이동에도 역전현상이 일어나게 하여 세포손상을 더욱 촉진하는 것으로 알려져 있다[6].

이렇게 나트륨통로의 개방이 허혈에 의한 생화학적 연속단계의 초기에 발생하면서 허혈성 손상주기 전 과정에 걸쳐 전반적인 가속페달 역할을 수행하기 때문에 이러한 나트륨 이온의 세포 내 유입을 억제하는 나트륨 이온통로 길항제가 일정 수준의 신경보호 효과를 보일 것으로 기대할 수 있다. 막전위 의존성 나트륨 이온통로 길항제는 임상에서 국소 마취제와 항부정맥제 외에도 항경련제를 포함하여 다양한 종류의 신경손상에도 널리 사용되는 잘 알려진 약물이다. 다양한 나트륨 이온통로 길항제가 저산소성 탈분극의 발현시기를 지연시켰다는 연구 결과가 있고[7], 최근에는 페니토인이 국소적이거나 미만성인 대뇌의 허혈성 손상모델에서 신경보호효과를 보였다는 내용이 보고되었다[8-10]. 또한 토끼를 이용한 허혈성 척수손상 모델에서 페니토인 투여로 하반신마비의 빈도를 줄였다는 보고가 있다[6]. 하지만 척수의 허혈성 손상에 대한 약리학적인 처치의 일환으로 나트륨 이온통로 길항제에 대한 연구 결과는 전반적으로 매우 드문 편이며, 페니토인의 경우 중추신경계를 중심으로 매우 극소수의 연구 결과만 보고되었다[8-11].

한편 전통적으로 허혈성 손상에 대한 조직 보호에 중심

적인 역할을 해온 저체온법은 신경조직의 경우에도 심한 손상을 막고 위급한 허혈시간을 연장시켜주는 역할을 하며 허혈성 척수손상에서도 일정한 수준의 척수보호 효과를 보인다는 사실은 잘 알려져 있다[12].

본 연구에서는 토끼를 이용한 허혈성 척수손상 모델을 사용하여 나트륨 이온통로 길항제의 하나인 페니토인의 척수보호 효능을 검증하되, 대동맥차단 시간 동안 수동적인 저체온을 허용한 기존의 연구들과 차별되게, 대동맥차단 시간 내내 중심체온을 일정한 수준으로 유지되게 하여, 저체온에 의한 척수보호 효과가 약물 자체에 의한 척수보호 효과에 미치는 영향을 완전히 배제하였다. 또한 페니토인의 약리학적 척수보호 효능이 있다면 그 정도는 어느 정도인지 알아보기 위해 전통적으로 가장 오래되고 널리 사용되어온 표준적인 척수보호 방법인 저체온법과 직접 비교 검정을 시도하였다.

대상 및 방법

1) 실험동물

무무게가 3.0 kg 전후의 뉴질랜드 산 토끼를 이용하였는데, 평균 3.02 ± 0.17 kg이었고, 암수의 비는 5 : 3이었다. 서울대학교 동물실험 위원회의 승인이 있었으며 국제적인 기준에 맞춰 실험이 이루어졌다. 실험 토끼는 적어도 실험 12시간 전부터 금식을 시켰으며 마취 전 모든 토끼가 신경학적으로 이상이 없음을 확인하였다.

2) 실험방법

모두 32마리의 토끼를 저체온의 도입 및 약물 투입 유무에 따라 8마리씩 무작위로 4군으로 나누었다. 정상체온을 유지하면서 복부 대동맥 차단 시간 동안 페니토인 대신 생리식염수만 주입한 군을 대조군으로(S39, n=8) 하여 정상체온을 유지하면서 페니토인만 주입한 경우(P39, n=8), 페니토인과 저체온의 효용성 비교를 위해 페니토인 주입 대신 생리식염수를 주입하면서 직장온도를 37°C로 낮춘 경우(S37, n=8), 그리고 저체온과 페니토인의 부가적인 효과가 있는 지 알아보기 위해 37°C 저체온 상태를 유지하면서 페니토인을 주입한 경우(P37, n=8) 등 모두 네 군으로 나누었으며 대동맥 차단 시간은 모두 25분으로 하였고 페니토인은 한림제약에서 제공된 페니토인(Peniton, HanLim pharmaceutical, Seoul, Korea) 100 mg을 정맥 주입을 위해 22~23°C 생리식염수 50 mL에 희석한 후 사용하였다. 모든 실험동물은 수술 후 24시간 및 72시간이 경과한 다

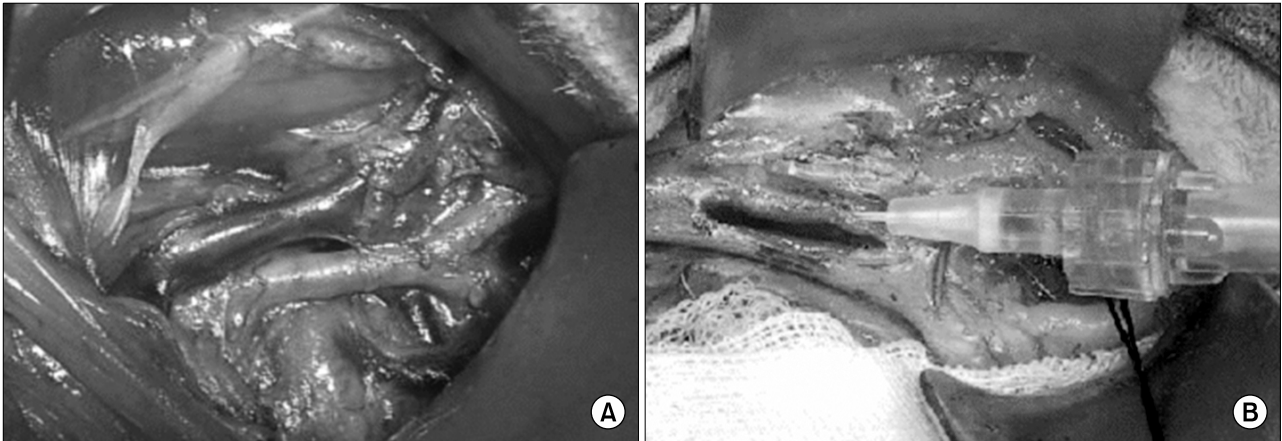


Fig. 1. (A) Experimental preparation of the abdominal aorta and inferior vena cava in a rabbit. (B) Retrograde venous perfusion through the inferior vena cava.

음 신경학적 평가를 시행하였고, 72시간 후에는 조직학적 검사를 위해 희생시켰다.

3) 수술방법

Ketamine hydrochloride 50 mg/kg과 xylazine hydrochloride 5 mg/kg을 근주하여 마취를 유도하였고, 자체 제작한 face cone을 통하여 1.2~3 vol%의 isoflurane과 100% 산소로 마취를 유지하고, 실험 중 자발 호흡을 유지시켰다. 마취 유도 후 토끼를 수술대에 위치시키고, 경피적 산소포화도와 심전도를 연속적으로 모니터하였고, 귀의 중앙 동맥에 22 게이지의 카테타를 위치시켜 연속적으로 혈압을 모니터 하였으며, 약물 투여 및 수액 주입을 위해 귀의 모서리정맥에 22 게이지의 카테타를 위치시켰다. 토끼의 체온은 항문을 통하여 직장 온도계를 일정한 길이만큼 전진시켜 직장 온도를 연속적으로 측정하여 마취 시작부터 재관류 10분까지 얼음 팩, 열 조절 담요, 가온 램프를 이용하여 직장온도 기준으로 체온을 군에 따라 정상체온 39°C와 정한 저체온 군 37°C로 일정하게 유지되도록 적극적으로 조처하였다. 혈류역학적 인자의 측정 및 동맥혈가스분석은 마취 유도 직후(Baseline), 대동맥 차단 직전(Pre-Ischemia), 대동맥 차단 10분 후(Ischemia, 10 min), 그리고 재관류 10분 후(Reperfusion, 10 min) 각각 시행하였으며, 대사성 산증 소견이 있을 때 적정 양의 sodium bicarbonate를 투여하였다. 실험 토끼의 복부 털을 깎은 후, 양와위로 위치시키고, 베타딘으로 수술 부위를 소독하고 무균적으로 드레핑을 하였다. 피부 절개 전에 항생제를(cefazolin sodium 10 mg/kg) 한번 정맥 투여하였다.

피부 절개는 정중 개복술로 수직으로 약 7 cm 정도의 절개를 가한 후, 복부 내 장기를 거즈로 싸서 오른쪽으로 제쳤다. 후복막을 열고 복부 대동맥과 하대정맥을 각각 좌측 신동맥의 기시부에서 복부대동맥이 장골동맥으로 분지하는 곳까지 박리한 다음 토니켓과 루프를 걸어 두었다. 페니토인과 대조군에서의 식염수 투여를 위해 하대정맥에 24게이지의 카테타를 위치시키고 관류펌프와 연결시켜 두었다(Fig. 1)

직장온도가 정해진 수준에 도달한 다음 척수허혈을 유도하기 위해 미리 걸어둔 토니켓과 루프를 이용하여 위로는 좌측 신동맥 기시부의 직하방에서 그리고 아래로는 복부대동맥의 분지부 직상방에서 복부대동맥을 차단하였으며 하대정맥의 경우도 동일한 위치인 좌측 신동맥의 기시부 직하방과 하대정맥의 분지부 직상방에서 차단하였다. 대동맥 차단 10분 전에 헤파린 150 U/kg을 정맥주사하고, 수술 후 중화하지 않았다. 대동맥 및 하대정맥 차단 시간 동안 약물 및 식염수 주입은 주사기 관류펌프를 이용하여 2 mL/min의 속도로 대동맥 차단시간 25분 내내 일정하게 주입하였다.

대동맥 차단시간이 종료되면 루프와 토니켓을 신속히 제거한 후 대동맥과 하대정맥의 상태를 확인하고 하대정맥에 위치한 24게이지 카테타는 제거한 다음 지혈을 위해 7/0 prolene 봉합사 이용하여 봉합해 주었다. 재관류 후 10분 동안 마취 상태를 유지하며 활력 징후를 관찰하면서, 수술 부위를 층별로 봉합하였으며 이 기간에 저체온을 유도한 군에서는 가온하여 가급적 빠른 시간 내에 정상체온에 도달하도록 하였다. 귀에 위치시켰던 카테타를 제거하

고 지혈을 확인하였다. 마취에서 깨기 전에 통증과 불안을 감소시키기 위해 ketorolac tromethamine 6 mg과 acepromazine 0.6 mg을 1회 근육주사 하였다. 마취에서 충분히 회복된 뒤 토끼를 우리로 옮겼으며, 수술 6시간 후부터 물과 음식을 자유로이 먹게 하였다.

수술 후 24시간 및 72시간이 경과한 다음 신경학적 평가를 시행하였다. 실험동물은 수술 후 3일째 조직학적 검사를 위해 희생시켰는데, ketamine hydrochloride 50 mg/kg과 xylazine hydrochloride 5 mg/kg을 혼합 근육주사 마취를 유도하고, 귀의 모서리정맥에 22 게이지의 카테타를 위치시켜 혈관을 확보한 후, thiopental sodium 50 mg/kg을 정맥주입하여 절명시킨 후, 10% 중성 포르말린 50 mL를 정맥주입하면서 심장 마사지를 하여 포르말린이 순환되게 하였다. 토끼의 절명을 확인하자마자 하부 흉부 및 요부 척추를 일괄 적출하였다. 적출한 척추를 10% 중성 포르말린에 보관하여 향후 조직학적 검사를 시행하였다.

4) 신경학적 평가

척수 기능의 평가는 아래와 같은 Tarlov scoring system 방법을 이용하였다[13].

0 등급: 하지의 운동이 전혀 없고, 경직성 하지 마비가 발생한 경우

1 등급: 하지의 운동성이 조금 있으며 경직성 하지 마비가 발생한 경우

2 등급: 하지의 움직임은 활발하나 스스로 앉을 수 없을 때

3 등급: 스스로 앉을 수는 있으나, 정상적으로 걸을 수 없을 때

4 등급: 완전히 회복된 경우

5) 병리학적 검사

(1) Hematoxylin-eosin 염색: 각 실험군의 요부 2, 3번 척수 조직을 2.5 cm 이상 절제하여 10% 중성포르말린에 담그고 2일 이상 고정시켰다. 척수 조직을 횡단면을 따라 2 mm 두께로 연속 절제하여 4개의 절편을 얻은 후, 모든 절편을 두개의 카세트에 나누어 슬라이드를 제작하였다. 통상적인 방법에 따라 10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매하여 4 μ m 두께로 박절하여 hematoxylin and eosin 염색을 시행하였다.

병리학적 평가는 각 실험군의 내용을 알지 못하는 신경병리학자에 의뢰하여 독립적으로 시행하였으며, 광학현미

경으로 신경세포의 호산성 변성 및 신경세포의 핵과 세포질의 형태학적 변화를 관찰하였다. 네 개의 척수 절편 중에서 허혈성 변화가 가장 심한 절편을 선택하여 병리조직학적 분석을 시행하였으며, 척수의 허혈 손상을 정량화하기 위하여 척수의 한 조직 단면의 회백질에 존재하는 신경세포의 수를 측정하였다. Caparrelli 등과 Wakamatsu 등의 방법을 준용하여 전체 신경세포 중에서 비가역적인 허혈성 손상 때 보이는 특징적인 세포인 붉은 신경세포가 관찰되는 비율과 경색 범위를 측정하여 아래와 같이 허혈성 변화의 등급을 나누어 정량적인 분석을 시행하였다[14,15].

0 등급: 붉은 신경세포가 관찰되지 않는 경우

1 등급: 붉은 신경세포가 전체 신경세포의 15% 미만

2 등급: 붉은 신경세포가 전체 신경세포의 15% 이상

3 등급: 국소 또는 경한 정도의 경색으로 경색 범위가 회백질의 25% 미만인 경우

4 등급: 광범위하고 심한 경색으로 경색 범위가 회백질의 25% 이상인 경우

각 실험군에 병리학적 등급을 매긴 후에 전체 32마리의 실험동물의 병리학적 등급과 신경학적 평가 사이의 상관관계를 측정하였고 실험군 간 병리학적 등급의 비교는 신경학적 평가와 동일한 방법으로 시행하였다.

(2) TUNEL assay: 세포자멸사의 정도를 정량화하기 위해서, 술 후 3일째 실험동물을 희생시킨 다음 각 군을 대상으로 TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick-end labeling) 분석을 시행하였다. TUNEL 분석은 TACS™ 2 TdT-DAB in situ apoptosis detection kit (Trevigen, Gaithersburg, USA)을 이용하였다.

파라핀 블록을 4 μ m 두께로 박절한 조직 슬라이드를 xylene으로 탈 파라핀하고 100%, 95%, 70% 알코올로 처리한 후 증류수로 함수시켰다. PBST (phosphate buffered saline + Tween 20) 용액에 10분 담근 후 1 : 200으로 희석한 proteinase K를 실온에서 30분간 반응시켰다. 증류수로 2분간 2번 수세한 후, 3% H₂O₂를 5분간 반응시켜 내재성 peroxidase의 비특이적인 반응을 차단한 후 PBST로 1분간 세척하였다. Labeling buffer에 5분간 처리한 후, labeling reaction mixture [TdT dNTP 1 μ L + Divalent cation (Mn⁺⁺) 1 μ L + TdT enzyme 1 μ L + labeling buffer 50 μ L] 50 μ L을 슬라이드에 떨어뜨리고 parafilm으로 덮은 후 4°C 습도조절 방에서 밤새 반응시켰다. Stop buffer를 5분간 처리한 후

Table 1. Physiologic parameters (S39; Control group, S37; hypothermia group, P39; normothermic phenytoin group, P37 hypothermic phenytoin group)

Groups	S39 (n=8)	P39 (n=8)	S37 (n=8)	P37 (n=8)
Weight (kg)	3.1±0.2	3.0±0.1	2.9±0.2	3.0±0.2
Rectal temperature (°C)				
Baseline	39.5±0.8	39.2±0.5	39.4±1.1	39.8±0.7
Pre-Ischemia	39.2±0.3	39.1±0.2	37.0±0.1	37.1±0.2
Ischemia, 10 min	39.0±0.1	38.9±0.2	37.1±0.3	37.0±0.2
Reperfusion, 10 min	38.8±0.3	38.7±0.2	36.8±0.2	36.9±0.1
MAP (mmHg)				
Baseline	82±9	79±15	81±12	76±9
Pre-Ischemia	78±10	75±9	77±12	67±9
Ischemia, 10 min	71±17	68±7	62±14	64±10
Reperfusion, 10 min	67±12*	60±15*	56±16*	58±13*

*p<0.05 vs preischemia. Values are means±SD. MAP=Mean arterial pressure.

PBST로 2분간 2번 수세하였다. Streptavidin 50 µL을 실온에서 25분간 반응시킨 후, PBST로 2분간 2번 수세하였다. DAB (diaminobenzidine) 용액으로 5분간 발색시킨 후, 증류수로 수세하였다. Methyl green으로 1분간 대조염색한 후, 증류수에 3번 짧게 수세하고 butanol에 2분씩 2번 담근 후에 xylene에 2분씩 4번 탈수과정을 거친 후에 커버슬라이드를 덮었다. 모든 과정은 습도조절 방에서 시행하였으며, 양성 대조군인 편도(tonsil) 조직을 실험군과 같은 조건으로 동시에 염색하여 TUNEL 분석의 기술적인 성공 여부를 판단하였다.

8개의 척수 절편 중에서 허혈성 변화가 가장 심한 절편, 즉 병리조직학적 분석을 시행하였던 척수 절편의 회백질에 존재하는 신경세포 중에서 TUNEL 염색에 양성인 신경세포의 수를 측정하였다.

6) 통계적 처리

자료의 분석 및 통계 처리는 전문 통계 프로그램 패키지인 SPSS (version 10.0 for Windows, Chicago, USA)를 이용하였으며, 연속변수는 평균±표준편차로, 범주형 변수는 중앙값(범위)을 나타내었으며, p 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 하였다. 대동맥차단 전후에 각각의 변수의 변화는 대동맥차단 전 값을 기준으로 Mann-Whitney rank sum 법으로 검정하였다. Tarlov 점수와 변성된 신경세포의 비율 사이의 연관성은 Spearman rank order

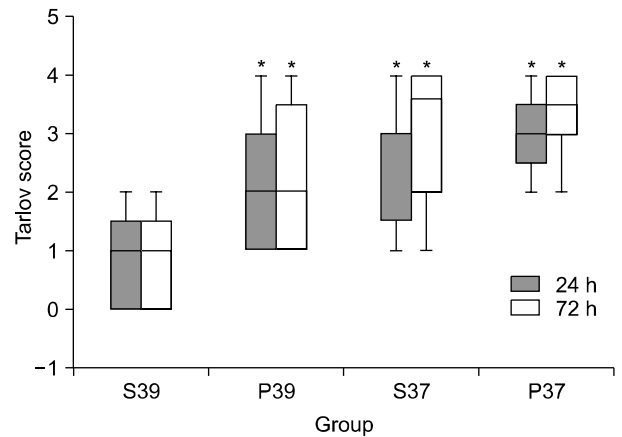


Fig. 2. Tarlov scores at 24 and 72 hours after the operation. *p<0.05 compared with the normothermic control group (Mann-Whitney U test). The box boundaries=The 25th to 75th percentiles. A thick line within the box=The medians. Whiskers above and below the box=The 10th to 90th percentiles.

correlation 법으로 검정하였으며, 각 군 간의 변성된 신경세포의 비율에 따른 병리조직학적 등급과 Tarlov 점수를 이용한 신경학적 평가는 비모수적 Mann-Whitney U test로 검정하되 Kruskal-Wallis test로 그룹 간 비교도 참조하였다.

결 과

1) 수술 후 일반적 사항

실험대상 토끼 38마리 중 6마리가 실험 완료 전에 사망하였는데, 두 마리는 각각 하대정맥과 복부대동맥의 파열로 실험 도중 사망하였으며, P39군의 두 마리, S39군과 S37군에서 각각 한 마리씩 모두 네 마리는 정상적으로 실험이 이루어진 후 하루가 지나 사망한 상태로 발견되었다. 나머지 32마리(84%)는 생존하였으며, 실험 후 3일째 신경학적 평가 후 조직학적 검사를 위해 안락사시켰다.

몸무게 3 kg 정도의 토끼 복부 대동맥의 직경은 대략 3 mm 정도였으며, 개복술을 통한 접근으로 복부 대동맥 및 하대정맥에 쉽게 접근할 수 있었다. 좌측 신동맥 및 신정맥, 복부 대동맥의 분지부 및 하대정맥의 분지부에 대한 확인이 용이하였고, 좌측 신동맥 원위부에서 복부 대동맥 분지까지 3개 정도의 척수 분절 동맥이 관찰되었다(Fig. 1). 수술에 따른 혈액학적 변화와 직장온도 등의 생리학적 지표는 Table 1에 제시하였다. 혈액학적 변화는 대동맥 차단 및 재관류 후 모든 군에서 대동맥 차단 전에 비해 평균

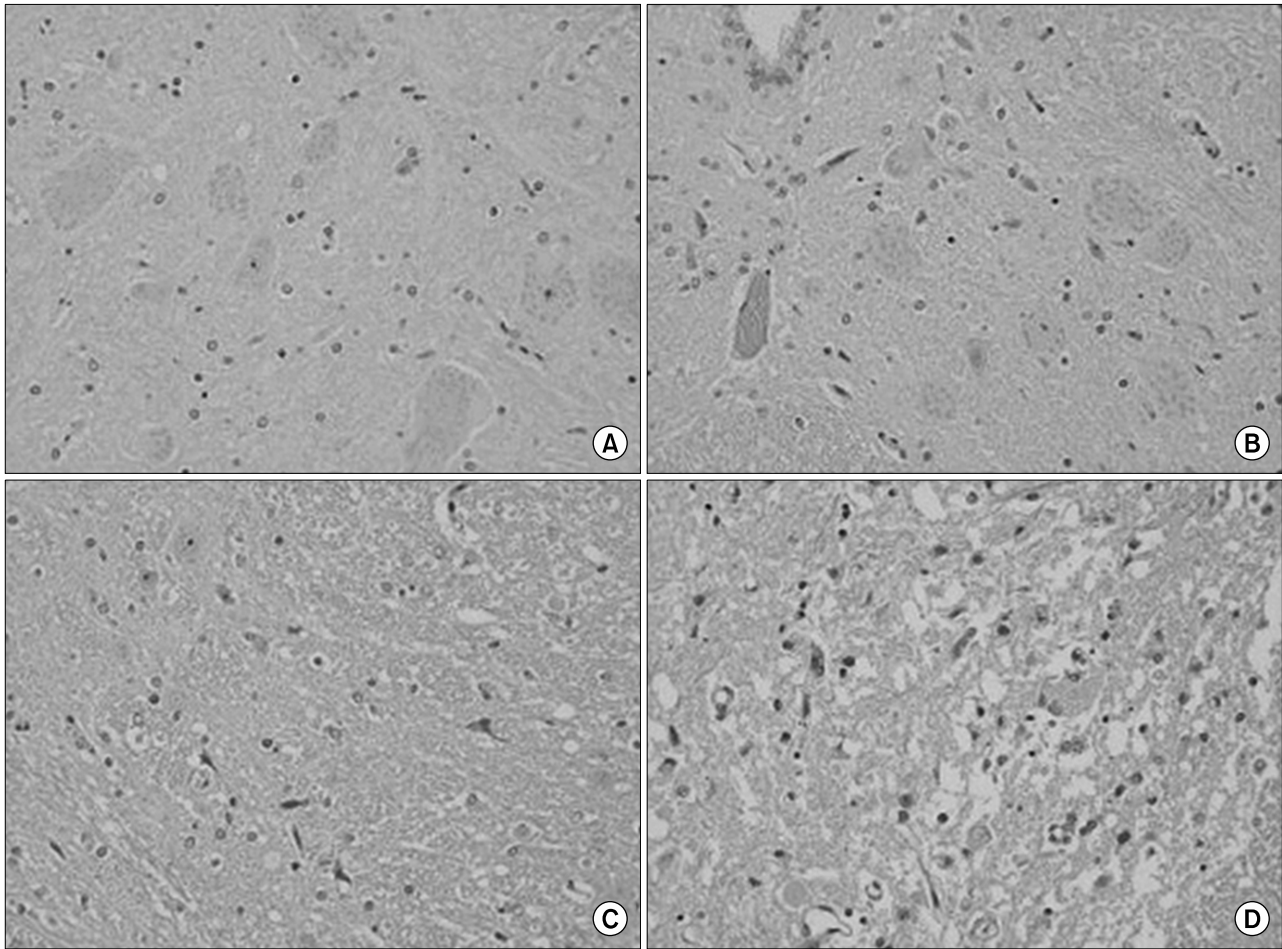


Fig. 3. Hematoxylin & eosin staining of the spinal cord segment at 72 hours after ischemia. Ischemic changes were minimal in a Group P37 (A). Ischemic red neurons were occasionally noted in Group P39 (B) and scattered in Group S37 (C). Histological features of infarction were prominent and ischemic red neurons were frequent in Group S39 (D) ($\times 100$).

동맥압이 감소하는 경향을 보였다. 직장온도는 모든 군에서 목표 온도인 39°C 및 37°C가 잘 유지되었다.

2) 신경학적 기능평가

Tarlov score에 따른 신경학적 평가의 결과는 각 군의 중앙값과 분포 범위로 표시되는 Boxplot 도표 형태로 표시하였다(Fig. 2). 술 후 1일째 시행한 신경학적 평가 결과는 S39, P39, S37, P37 순으로 Tarlov score의 중앙값(범위)이 각각 1 (0~2), 2.5 (1~3), 3 (1~4), 3 (3~4)였다. 술 후 3일째 시행한 신경학적 평가 결과는 1 (0~2), 2.5 (1~4), 3 (1~4), 4 (3~4)로 술 후 1일째 결과와 비교하여 유의한 차이는 없었다.

25분 대동맥 차단시간 내내 정상 체온을 유지하면서 페

니토인을 투여하지 않은 대조군(S39)에서는 8마리 중 6마리에서 경직성 마비를 보였고 나머지 2마리도 하지의 움직임은 관찰되었으나 앓을 수 없는 정도의 신경학적 손상을 보여 비교적 안정적인 허혈성 척수손상 모델로 평가되었다.

저체온과 페니토인의 척수보호 효과를 알아보기 위해 S39군을 대조군으로 하여 직장온도를 2°C 낮춘 S37군과 페니토인 100 mg을 투여한 P39군 사이에 유의성을 검증한 결과 두 군 모두 유의한 정도로 척수보호 효과를 보였으나($p < 0.05$), 두 군 사이의 척수보호 효과에는 차이가 없었다. 또한 직장온도도 2°C 낮추고 페니토인도 투여한 P37군의 경우는 8마리 중 5마리는 정상 소견을 보였으며 3마리만 가벼운 마비 증세를 보여 네 군 중 가장 좋은 결

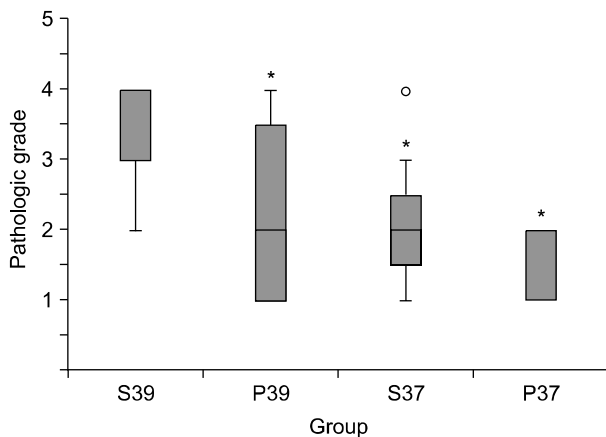


Fig. 4. Histopathological grading in the gray matter at 72 hours after ischemia. * $p < 0.05$ compared with the normothermic control group (Mann-Whitney U test). The box boundaries=The 25th to 75th percentiles. A thick line within the box=The medians. Whiskers above and below the box=The 10th to 90th percentiles. Open circle=Full range of data.

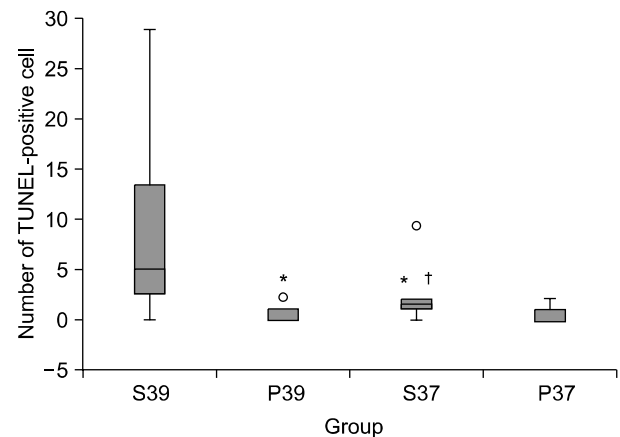


Fig. 5. Total number of TUNEL-positive cell at 72 hours after the operation. * $p < 0.05$ compared with the normothermic control group (Mann-Whitney U test). † $p < 0.05$ compared with the hypothermic phenytoin group (Mann-Whitney U test). The box boundaries=The 25th to 75th percentiles. A thick line within the box=The medians. Whiskers above and below the box=The 10th to 90th percentiles. Open circle=Full range of data.

과를 보였다.

저체온 또는 페니토인을 단독으로 사용하였을 때에 비해 저체온과 페니토인을 병용하였을 때 추가적인 척수보호 효과를 보이는 지 검정해보았으나 유의한 차이는 없었다.

3) 병리학적 검사 결과

(1) Hematoxylin and eosin 염색: 형태학적 검사에서 정상체온 대조군에서 속한 동물은 대부분 광범위한 척수 회백질의 괴사를 보였으며 현저한 신경세포의 손실과 심한 부종을 보이면서 red neuron의 전형적인 형태를 보이는 세포가 잘 관찰되었다. 이에 반해 저체온 페니토인 군에 속한 대부분의 동물에서는 Nissl 소체를 풍부하게 갖고 있는 커다란 신경세포가 허혈성 변화를 거의 보이지 않는 정상적인 형태를 유지하고 있었다. 저체온이나 페니토인 단독으로 투여 받은 군에서는 매우 다양한 정도의 허혈성 손상을 보였으나 정상체온 대조군에 비해서는 허혈성 손상의 정도가 많이 감소한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

병리학적 등급에 따른 결과는 각 군의 중앙값과 분포 범위로 표시되는 Boxplot 도표 형태로 표시하였다(Fig. 4). 신경학적 평가와의 상관관계를 분석하였는데 상관계수 -0.63로 조직학적 손상 정도와 신경학적 평가 사이에 유의한 관계가 있었다($p=0.00$).

병리조직학적 등급의 중앙값(범위)은 S39, P39, S37, P37

군 순서로 4 (2~4), 2 (1~4), 2 (1~4), 1 (1~2)이었다. 저체온과 페니토인의 척수보호 효과를 알아보기 위해 S39군을 대조군으로 하여 S37군과 P39군 사이에 유의성을 검증한 결과 두 군 모두 신경학적 평가 결과처럼 유의한 수준의 척수보호 효과를 보였다($p < 0.05$). 또한 직장온도도 낮추고 페니토인도 투여한 P37군의 경우는 병리조직학적 등급이 3마리에서 2, 나머지 5마리에서는 1로 손상 정도가 가장 적었다. 한편 저체온을 유지하면서 페니토인 효과를 비교했을 때와(S37 vs P37) 페니토인을 투여하면서 저체온 효과를 비교하였을 때는(P39 vs P37) 두 경우 모두 손상 정도는 감소하는 경향을 보였으나 통계학적인 유의성을 보이지 않았다.

(2) TUNEL assay: 실험 군과 같은 조건으로 동시에 염색하여 양성 대조군으로 사용한 편도(tonsil) 조직에서 TUNEL 염색이 기술적인 문제없이 성공적으로 시행되었음을 확인하였다. 실험 군에서 짙은 갈색의 양성반응은 허혈성 손상을 받은 세포의 핵에서 주로 관찰되었으며, 양성반응을 보이는 아교세포를 제외한 신경세포의 수를 측정하였고 그 결과는 각 군의 중앙값과 분포 범위로 표시되는 Boxplot 도표 형태로 표시하였다(Fig. 5).

TUNEL 염색에 양성인 신경세포는 경색 주위에서 흔히 관찰되었으며, 병리학적 검사에서 red neuron의 형태를 보이는 세포들이 주로 TUNEL 염색에 양성반응을 보였기 때

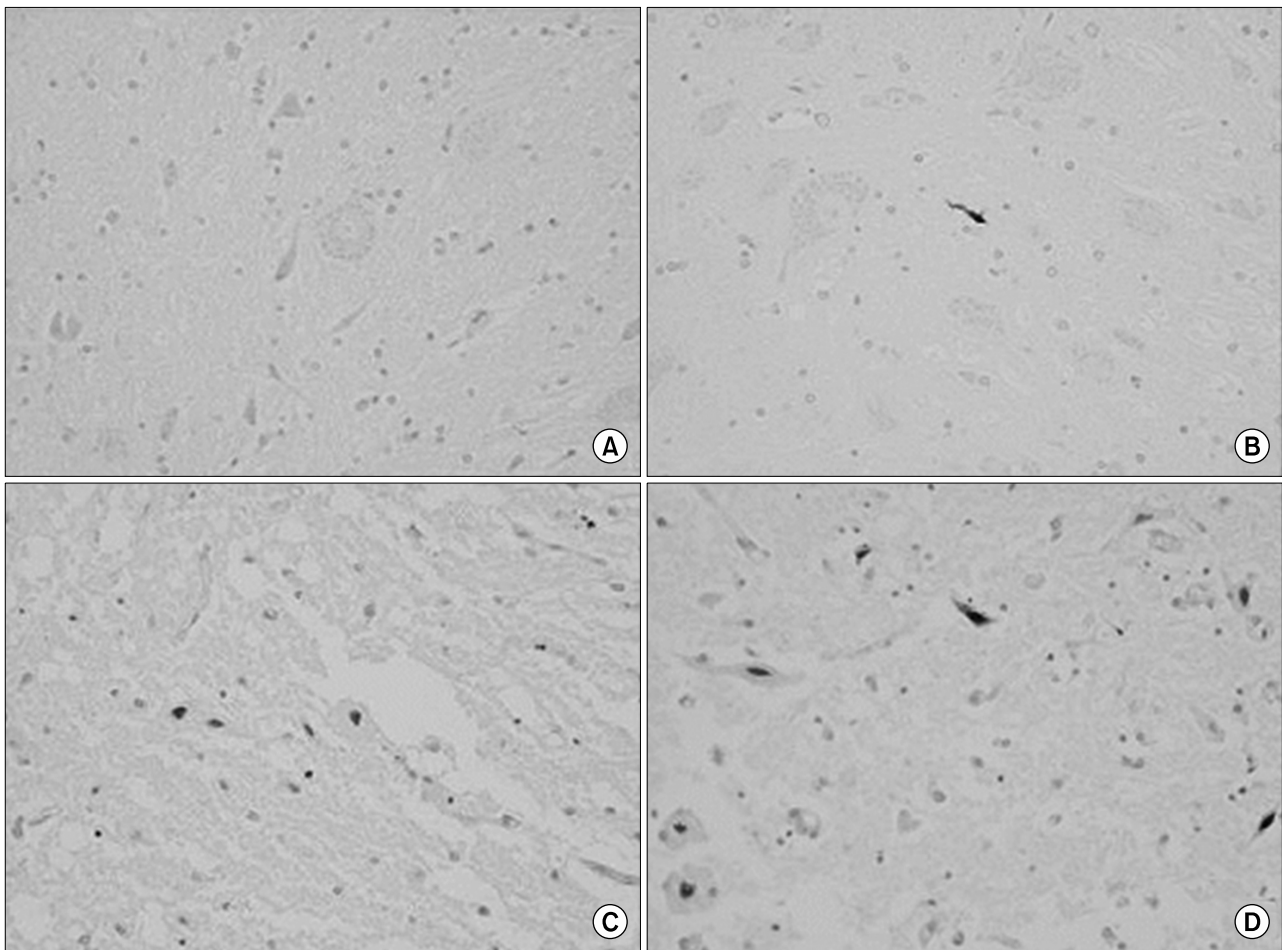


Fig. 6. TUNEL staining of the spinal cord segment at 72 hours after ischemia. No TUNEL-positive apoptotic cell was noted in a Group P37 (A). Note a single TUNEL-positive apoptotic cell in a Group P39 (B). TUNEL-positive apoptotic cells were scattered in a Group S37 (C). TUNEL-positive apoptotic cells were frequent in a Group S39. TUNEL-positive cells were considered to be ischemic red neurons (D) ($\times 100$).

문에 형태학적인 분석과 TUNEL 분석은 대체적으로 일치하는 소견을 보일 것으로 기대되었고 TUNEL 염색 결과와 Hematoxylin-eosin 염색에 의한 허혈성 손상의 병리학 적 정도와의 상관관계 분석에서도 상관계수 0.72로 유의한 관계를 나타내었다($p < 0.001$).

정상체온을 유지하면서 페니토인을 투여하지 않은 대조군에서는 TUNEL 염색에 양성인 신경세포가 높은 빈도로 관찰되었으며, 저체온 또는 페니토인 투여 군에서는 상대적으로 매우 낮은 빈도의 양성세포가 비슷한 정도로 관찰되었고, 저체온을 유지하면서 페니토인을 투여한 경우에는 양성세포가 거의 관찰되지 않아(Fig. 6), 저체온과 페니토인의 투여가 완전하지는 않지만 TUNEL 염색에 양성인 신경세포의 출현을 상당 부분 억제하는 것으로 판명

되었다. 양성반응을 보이는 신경세포의 중앙값과 범위는 S39, P39, S37, P37군 순서로 5 (0~29), 1 (0~3), 1.5 (0~13), 0 (0~2)개였다. S39군을 대조군으로 하여 S37군과 P39군 사이에 유의성을 검증한 결과 두 군 모두 신경학적 평가 결과처럼 유의한 수준의 척수보호 효과를 보였으나 ($p < 0.05$), 어느 방법이 더 우월하다고 할 수는 없었다.

고 찰

본 연구에서 설정한 주안점은 막전위 의존성 나트륨통로 길항제로 알려진 페니토인의 허혈성 척수손상에 대한 신경보호효과를 검증하는 것이었으며, 이에 추가하여 이 약제의 효용성이 유의한 수준이라면 그 정도는 대략 어느

정도인지 알아보는 것이었다. 토끼 허혈성 척수손상 모델을 이용하여 특정 약물의 척수보호 효과를 검정한 기존의 연구는, 대부분 대동맥 차단 전이나 차단 시간 동안 수동적인 저체온을 허용함으로써 저체온 때 기대되는 척수보호 효과가 약물 자체의 효용성에 미치는 영향을 간과한 측면이 많았다. 또한 경막외 국소관류를 통해 척수온도를 15°C까지 낮추어 60분의 허혈에도 잘 견뎠다는 보고도 있고[16] 정상체온보다 2°C 정도만 낮추는 경한 전신 저체온 만으로도 우수한 신경보호효과를 보였다는 다수의 보고가 있었다[17-19]. 본 연구에서는 이러한 점에 유의하여 허혈 시간 동안 직장온도가 일정하게 유지되도록 하여 허혈 기간 동안의 온도변화가 신경보호효과에 미칠 수 있는 가능성을 철저히 배제하도록 하였다.

하반신마비는 허혈성 손상을 받은 척수에서 조직학적 외형의 변형과 아울러 운동신경 세포의 손실, TUNEL 염색 양성의 운동세포 출현 등과 밀접히 연관되어 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구 결과 페니토인의 역행성 주입에 따른 심각한 문제는 없었으며 신경학적 평가와 조직병리학적 검사 모두 일관되게, 페니토인과 저체온 둘 다 정상체온 대조군에 비해 유의한 수준의 신경보호효과를 보였으나 그 정도 면에서 유의한 차이는 보이지 않았다. Tarlov score로 평가한 신경학적 손상 정도는 정상체온 대조군에 속한 모든 동물은 완전 또는 심한 하반신 마비 소견을 보인데 반해 페니토인과 저체온을 단독으로 사용한 군에서는 대조군에 비해 유의한 수준의 신경보호효과를 보였다. 또한 페니토인과 저체온을 함께 적용한 P37군에 속한 동물은 부분적인 마비 소견은 보이는 경우가 있긴 했지만 완전 또는 심한 정도의 하지마비 소견을 보이는 경우는 없어 세 군 중 가장 우수한 신경학적 평가 결과를 보여주었다. 이러한 신경학적 평가 결과는 척수 회백질의 운동신경세포의 괴사 정도로 정량화한 조직병리학적 등급과 TUNEL 염색 양성의 운동세포 출현 억제 면에서도 일관된 결과를 보여 주었다.

또한 부가적인 효과를 알아보기 위해 같은 저체온 상태에서 페니토인의 투여 여부와 페니토인을 투여 받는 동물에서 저체온의 적용 유무가 신경보호효과에 미치는 영향을 알아본 바, 페니토인과 저체온 모두 어느 정도의 부가적인 효과를 비슷한 정도로 보여주었으나 통계학적인 유의성에는 이르지 못했다. 이는 아마도 허혈성 척수 손상의 세포기전에서 페니토인과 저체온에 의한 신경보호효과가 일정 부분은 중첩된 결과라고 추정되었다. 하지만 저체온-페니토인 군에 속한 동물 모두 신경학적 결손이

없이 완전 회복되었거나 경미한 정도의 마비 증세만 보인 것에 비해 저체온이나 페니토인 단독 적용한 군에서는 3일 후 심한 하지마비를 보인 동물이 각각 네 마리와 두 마리가 있었던 점을 감안해 볼 때 좀 더 많은 수의 실험동물을 추가한다면 통계적으로도 유의한 수준에 이를 수도 있었을 것으로 추정되었다.

한편 Gangemi 등은 45분 허혈 시간 동안 100 mg의 페니토인을 약 22°C 생리식염수에 녹여 0.8 mL/kg/min의 속도로 역행성 정맥 투여 한 결과 대다수의 동물이 완전 회복하였다고 보고하였는데[6] 실험방법과 평가 기준이 달라 직접 비교하긴 어렵지만 본 연구에서는 상대적으로 짧은 25분의 허혈 시간에도 불구하고 8마리 중 네 마리는 중정도 이상의 하반신 마비를 보여 대조적인 결과를 보였다. Gangemi 등의 실험에서 비록 허혈 시간이 20분 가량 상대적으로 길었지만 역행성으로 주입된 22°C 생리식염수의 양이 많았고 수동적인 저체온을 허용하였다는 측면과 Gangemi 등의 이전 실험에서 평균 직장 온도가 34°C 정도로 측정된 점, 또한 이들의 연구 결과가 본 연구에서의 저체온-페니토인 군에 속한 동물의 신경학적 평가 결과와 유사한 수준이었던 점으로 미루어 볼 때 이는 전신저체온의 신경보호효과가 중첩된 결과 때문으로 판단되었다.

저체온을 이용하여 일시적인 중추신경계의 허혈로부터 신경손상을 최소화하려는 노력은 가장 오래되고 널리 사용되어온 표준적인 방법이다. 저체온은 중추신경계의 산소소모량을 약 5%가량 줄이며 ATP의 손실을 줄일 뿐만 아니라 세포막을 안정시키고, 단독으로도 글루타메이트의 축적을 줄이고 흥분성 신경독성을 감소시킨다고 알려져 있다. 수술 내용에 따라 다르겠지만 허혈성 조직손상이 우려되는 경우 전신 저체온 하에서 수술을 시행하기도 하나 중정도 이상의 저체온에서는 부정맥을 포함한 심장 합병증과 혈액응고장애 등의 위험성이 증가하는 것으로 알려져 있다[20]. 따라서 대부분의 외과적 대동맥류 수술 시 경한 정도의 수동적인 저체온을 허용하는 정도이고 소수에서만 흉복부 대동맥 수술 같은 경우 초저체온을 이용하거나 척수온도를 일정 수준 내리기 위해 능동적으로 경한 정도의 저체온을 유도하기도 한다. 전신저체온에 따른 여러 가지 문제를 피하기 위해 일부에서는 저온의 혈액 또는 수액을 척수 관류혈관이나, 지주막하, 경막외 등을 통해 국소 관류시켜줌으로써 국소 저체온을 유도하려는 시도도 있으나 실제로 시행하기에는 많은 어려움이 따르고 경우에 따라서는 뇌척수액의 압력을 높일 수도 있다.

본 연구 결과 25분 정도의 척수허혈 시간에 대해 직장

온도를 2°C 정도 낮추는 저체온법이 가지는 신경보호효과는 중정도 이상의 하반신 마비를 보인 동물이 두 마리, 그리고 경증의 하지마비를 보인 경우가 네 마리 포함되어 있어 완전히 만족할 만한 수준은 아니었지만 신경학적 평가만으로는 페니토인 투여보다 조금 나은 경향을 보였다. 최근까지 실험적인 수준에서는 약리학적 방법 단독으로도 척수의 허혈성 신경손상을 상당 부분 줄일 수 있었다는 보고는 많았지만 임상 적용 수준의 합의가 이루어진 것은 거의 없는 실정이다. 이는 아마도 어느 약물의 단독 투여만으로는 대단히 복잡다단한 경로를 거쳐 진행될 것으로 추정되는 신경세포의 허혈성 손상을 완전히 차단하기가 어렵기 때문일 것이다. 따라서 보다 나은 신경보호 효과를 기대하기 위해서는 본 연구의 경우처럼 약제투여와 저체온법을 병용한다던지, 약물 사용의 경우라도 서로 부가적이거나 상승작용을 일으킬 수 있는 약물을 병용해서 사용하는 방법들이 고려되어야 할 것이다.

본 연구에서 사용된 토끼 척수의 허혈성 손상 모델은 복부를 열고 신동맥 직하부와 복부대동맥 분지부 상방에서 토니켓과 루프를 이용하여 복부대동맥을 차단하는 것으로 척수허혈을 유도하는 방법인데 토끼의 척수가 인간과 달리 좌 신동맥 원위부의 복부 대동맥으로부터 분기하는 분절동맥들에 의해 혈류공급이 이루어지면서, 분절 사이에 부행지 혈관이 적어 복부 대동맥 차단만으로 척수의 허혈성 손상이 재현성 높게 초래된다는 사실에 근거한다[21]. 이러한 척수의 허혈-재관류 손상에 대한 연구 모델은 허혈성 척수손상에 대한 치료 및 예방뿐만 아니라 흉부외과 영역에서 완전순환정지가 필요한 경우, 즉 선천성 복잡 심장 기형 수술이나 성인에서 상행대동맥 및 대동맥궁을 침범한 대동맥 박리증이나 대동맥류 수술 시 발생할 수 있는 뇌 손상의 기전, 치료 및 예방을 위한 연구에도 도움이 될 것으로 생각된다.

본 연구에서는 실험동물의 숫자가 상대적으로 부족하고 세부적인 그룹 분할에 제한된 점이 있었던 것을 차치하더라도 다음과 같은 점들이 제한점으로 고려될 수 있겠다. 첫째, 본 연구에서는 신경학적 또는 조직병리학적 평가를 손상 후 72시간으로 제한하였는데 하지마비와 같은 신경학적 합병증이 실험적 혹은 임상적으로도 일주일 혹은 수주가 지나 지연 발현되는 경우가 있으므로 좀 더 장기간의 관찰이 필요했다. 하지만 심한 경직성 하지마비를 동반한 실험동물의 장기사육은 동물보호 차원의 윤리적 문제를 야기할 수 있는 바 본 연구에서는 부득이 그 관찰 시한을 72시간으로 제한하였다. 둘째, 마취 유도 시 ketamine을 근

육주사하고, isoflurane을 흡입시켜 마취를 지속시켰는데, 이러한 약물들이 칼륨채널 활성화와 관련되어 척수의 허혈성 손상을 줄여주었다는 보고가 있으므로[22,23] 이러한 약물들이 결과에 미칠 수 있는 영향을 충분히 고려하지 못했다. 셋째, 척수는 중추신경계의 일부로서 허혈성 손상에 대해 서로 다른 기전과 취약성을 보이는 백질과 회백질로 구성되어 있다는 점에서 특히 척수백질 부분에 대한 조직병리학적 평가가 미비한 부분이 있었다.

결 론

토끼의 허혈성 척수 손상 모델을 이용하여 나트륨 이온통로 길항제인 페니토인과 저체온의 신경보호효과를 알아본 결과 신경학적 평가와 조직병리학적 검사 결과 모두 유의한 수준의 신경보호효과를 일치되게 보여주었으며 페니토인의 척수보호효과 정도는 직장온도를 약 2°C 정도 낮추었을 때의 결과와 유사한 정도였다. 페니토인과 저체온을 병행하였을 경우 어느 정도 부가적인 효과를 보였지만 유의한 수준에는 미치지 못하였다. 페니토인은 임상에서 항경련제, 항부정맥제 등으로 널리 사용되어 안정성이 입증되었으며 경구 및 정맥 투여가 가능하여 투약의 편의성이 용이한 약제로 적절한 수준의 저체온법과 결합하여 사용한다면 여러 장기의 허혈성 손상에 대한 치료 및 예방에 임상 적용도 가능할 것으로 생각된다. 하지만 추후 허혈 지속 시간, 페니토인의 투여 시기나 기간, 방법, 적절한 용량에 대해서는 추가 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

1. Kouchoukos NT, Rokkas CK. Hypothermic cardiopulmonary bypass for spinal cord protection: rationale and clinical results. Ann Thorac Surg 1999;67:1940-2.
2. Coselli JS, LeMaire SA, Miller CC. Mortality and paraplegia after thoracoabdominal aortic aneurysm repair: a risk factor analysis. Ann Thorac Surg 2000;69:409-14.
3. Gharagozloo F, Gharagozloo F, Larson J, Dausmann MJ, Neville RF Jr, Gomes MN. Spinal cord protection during surgical procedures on the descending thoracic and thoracoabdominal aorta: review of current techniques. Chest 1996;109:799-809.
4. Crawford ES, Svensson LG, Hess KR, et al. A prospective randomized study of cerebrospinal fluid drainage to prevent paraplegia after high-risk surgery on the thoracoabdominal aorta. J Vasc Surg 1991;13:36-46.
5. Hains BC, Saab CY, Lo AC, Waxman SG. Sodium

- channel blockade with phenytoin protects spinal cord axons, enhances axonal conduction, and improves functional motor recovery after contusion SCI. *Exp Neurol* 2004;188:365-77.
6. Gangemi JJ, Kern JA, Ross SD, et al. Retrograde perfusion with a sodium channel antagonist provides ischemic spinal cord protection. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1744-8.
7. Weber ML, Taylor CP. Damage from oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is prevented by tetrodotoxin, lidocaine and phenytoin without blockade of action potentials. *Brain Res* 1994;664:167-77.
8. Taft WC, Clifton GL, Blair RE, DeLorenzo RJ. Phenytoin protects against ischemia-produced neuronal cell death. *Brain Res* 1989;483:143-8.
9. Boxer PA, Cordon JJ, Mann ME, et al. Comparison of phenytoin with noncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonists in a model of focal brain ischemia in rat. *Stroke* 1990;21(Suppl. III):47-51.
10. Rataud J, Debarnot F, Mary V, Pratt J, Stutzmann JM. Comparative study of voltage-dependent sodium channel blockers in focal ischaemia and electric convulsions in rodents. *Neurosci Lett* 1994;172:19-23.
11. Hains BC, Saab CY, Lo AC, Waxman SG. Sodium channel blockade with phenytoin protects spinal cord axons, enhances axonal conduction, and improves functional motor recovery after contusion SCI. *Exp Neurol* 2004;188:365-77.
12. Svensson LG, Hess KR, D'Agostino RS, et al. Reduction of neurologic injury after high-risk thoracoabdominal aortic operation. *Ann Thorac Surg* 1998;66:132-8.
13. Simpson JJ, Eide TR, Schiff GA, et al. Effect of nitroglycerin on spinal cord ischemia after thoracic aortic cross-clamping. *Ann Thorac Surg* 1996;61:113-7.
14. Wakamatsu Y, Shiiya N, Kuniyara T, Watanabe S, Yasuda K. The adenosine triphosphate-sensitive potassium channel opener nicorandil protects the ischemic rabbit spinal cord. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:728-33.
15. Caparrelli DJ, Cattaneo SM, Bethea BT, et al. Pharmacological preconditioning ameliorate neurological injury in a model of spinal cord ischemia. *Ann Thorac Surg* 2002;74:838-45.
16. Tabayashi K, Niibori K, Konno H, Mohri H. Protection from postischemic spinal cord injury by perfusion cooling of the epidural space. *Ann Thorac Surg* 1993;56:494-8.
17. Busto R, Dietrich WD, Globus MYT, Valdes I, Sheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intra-ischemic brain damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987;7:729-38.
18. Busto R, Globus MYT, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 1989;20:904-10.
19. Welsh FA, Sims RE, Harris VA. Mild hypothermia prevents ischemic injury in gerbils hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990;10:557-63.
20. Crawford ES, Coselli JS, Safi HJ. Partial cardiopulmonary bypass, hypothermic circulatory arrest, and posterolateral exposure for thoracic aortic aneurysm operation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;94:824-7.
21. Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Dupont H, Widmann C, Lazdunski M. Prevention of ischemic spinal cord injury: comparative effects of magnesium sulfate and riluzole. *J Vasc Surg* 2000;32:179-89.
22. Han J, Kim N, Joo H, Kim E. Ketamine abolishes ischemic preconditioning through inhibition of K (ATP) channels in rabbit hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:13-21.
23. Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, et al. Differential effects of anesthetics on mitochondrial K (ATP) channel activity and cardiomyocyte protection. *Anesthesiology* 2002;97:15-23.

=국문 초록=

배경: 흉부 및 흉복부 대동맥의 수술 중 대동맥 차단은 허혈성 척수 손상에 의한 하반신 마비와 같은 심각한 합병증을 유발할 수도 있어 수술 중 허혈성 척수손상을 예방하기 위한 여러 방법의 연구가 계속 되고 있다. 최근에 허혈성 대뇌 손상 모델에서 신경조직의 막전위 의존성 나트륨채널 길항제가 대뇌 보호 효과가 있다는 보고가 있다. 본 연구는 토끼의 허혈성 척수손상 모델에서 나트륨채널 길항제인 페니토인과 저체온의 척수보호효과를 비교해 보고자 시행되었다. **대상 및 방법:** 뉴질랜드산 토끼의 실험대동맥에서 복부대동맥을 25분간 차단하는 방식으로 척수허혈을 유도하였으며 각 군당 8마리씩 네 군으로 나누었다. 대조군과(S39) 저체온군은(S37) 대동맥 차단시간 동안 직장온도를 각기 39°C와 37°C로 일정하게 유지하면서 22°C 생리적 식염수만 2 mL/min 의 속도로 연속 주입하였으며, 정상체온 및 저체온 페니토인 군은(P39, P37) 앞의 두 군과 동일한 방법으로 하되 생리적 식염수에 페니토인을 녹여 주입하였다(100 mg/50 mL). 수술 후 24시간 및 72시간이 경과한 다음 Tarlov scoring을 통해 신경학적 평가를 시행하였고 마지막 평가 후에는 객관적으로 신경손상의 정도를 정량화하기 위해 척수를 고정 처리하였다. **결과:** 페니토인의 역행성 주입에 따른 심각한 문제는 없었으며 대조군에(S39) 속한 모든 동물은 완전 또는 심한 하반신 마비 소견을 보였다. 페니토인과(P39) 저체온(S37)군 모두 대조군에 비해 신경학적 평가는 유사한 정도로 우수한 결과를 보였다($p < 0.05$). 조직병리학적 검사 결과, 대조군에 속한 모든 동물은 척수 회백질에서 심한 신경조직 괴사 때 보이는 전형적인 특징을 보여주었으며, TUNEL 염색에 양성인 신경세포도 높은 빈도로 관찰되었으나, 저체온 또는 페니토인 투여 군에서는 괴사현상이 유의한 정도로 감소하였으며, 상대적으로 매우 낮은 빈도의 TUNEL 염색 양성세포가 관찰되었다($p < 0.05$). 그러나 저체온과 페니토인을 병용했을 때의 추가적인 척수보호효과를 조사해 본 결과 신경학적 평가와 조직병리학적 결과 모두 유의한 수준의 추가적인 효과는 없었다. **결론:** 결론적으로, 토끼의 허혈성 척수 손상 모델을 이용하여 페니토인과 저체온의 신경보호효과를 알아본 결과 신경학적 평가와 조직병리학적 검사 결과 모두 추가적인 효과는 보여주지 못했지만 각각의 경우 유사한 정도의 신경보호효과를 보여주었다.

중심 단어 : 1. 허혈
2. 척수
3. 페니토인